

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-065246

(43)Date of publication of application : 05.03.2002

(51)Int.Cl. C12M 3/00
C08J 7/00
C12N 5/06
// C08L 33:14

(21)Application number : 2000-227027

(71)Applicant : SUMITOMO BAKELITE CO LTD

(22)Date of filing : 27.07.2000

(72)Inventor : WATANABE YOSHIKI

(30)Priority

Priority number : 2000180335

Priority date : 15.06.2000

Priority country : JP

(54) CELL CULTURE SUBSTRATE, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD FOR CULTURING CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a culture substrate for stably culturing a cell and to provide a method for producing the culture substrate and a method for culturing using the same.

SOLUTION: This cell culture substrate is obtained by exposing a poly(2- hydroxyethyl methacrylate) to radiation and compounding the poly(2- hydroxyethyl methacrylate) with a cell adhesive polymer. The method for producing the cell culture substrate is provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 12.05.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 08.04.2005

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-65246

(P2002-65246A)

(43)公開日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	A 4 B 0 2 9
C 0 8 J 7/00	C E Y	C 0 8 J 7/00	C E Y Z 4 B 0 6 5
	3 0 5		3 0 5 4 F 0 7 3
C 1 2 N 5/06		C 0 8 L 33:14	
// C 0 8 L 33:14		C 1 2 N 5/00	E
審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 3 頁)			

(21)出願番号 特願2000-227027(P2000-227027)

(22)出願日 平成12年7月27日(2000.7.27)

(31)優先権主張番号 特願2000-180335(P2000-180335)

(32)優先日 平成12年6月15日(2000.6.15)

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000002141

住友ベークライト株式会社

東京都品川区東品川2丁目5番8号

(72)発明者 渡辺 芳明

秋田市土崎港相染町字中島下27-4 秋田

住友ベーク株式会社内

Fターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08

CC11 GA03 GA08

4B065 AA91X BA30 BB01 BB23

BB34 BC01 BC41 BC50 BD50

CA46

4F073 AA01 BA18 BB01 CA41

(54)【発明の名称】 細胞培養基質、その製造方法及び細胞培養方法

(57)【要約】

【課題】 細胞を安定に培養するための培養基質及び製造方法とこれを用いる培養方法を提供する。

【解決手段】 ポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)に放射線を照射し細胞接着性高分子と複合化する細胞培養基質及び製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)に放射線を照射し細胞接着性高分子と複合化することを特徴とする細胞培養基質の製造方法。

【請求項2】 細胞接着性高分子が塩基性高分子及び細胞接着性蛋白質の少なくとも一つからなる請求項1記載の細胞培養基質の製造方法。

【請求項3】 放射線がガンマ線である請求項1又は2記載の細胞培養基質の製造方法。

【請求項4】 請求項1～3記載のいずれかの製造方法で作られることを特徴とする細胞培養基質。

【請求項5】 請求項4記載の細胞培養基質を用いることを特徴とする細胞培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞培養に関わる技術であり、さらに詳しくは、細胞培養基質、その製造方法及び培養方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】通常の細胞培養の方法は均一な培養面をもつ培養基質を用いて行われる。具体的には、ガラスやポリスチレンなどの透明な材料を一定の形状に成形した容器を用いる。細胞の接着性を高めるため、ポリスチレンなどの疎水性の材料は表面を親水化するなどの表面改質を施したものが用いられる。また塩基性の高分子(ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリリジン等)や細胞接着性蛋白質(フィブロネクチン、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン等)をコートすることにより、接着性をより高める方法もよく用いられている。

【0003】培養面を不均一にして行う培養方法も用いられるようになってきた。すなわち、培養細胞を一定の形態に制御したり、他の細胞から隔離し単一細胞のみの培養環境を得たり、複数の細胞間の相互作用を検討するなどの目的で用いられている。また、平面的ではなく、球状の細胞集塊構造を形成させる培養方法もある。神経幹細胞や毛根細胞などの培養に用いられている。それぞれの培養方法はその目的や利便性などにより、細胞固有の培養方法としてではなく、さまざまに使い分けられている。

【0004】ポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)は細胞非接着性高分子としてよく用いられているものである。細胞の集塊構造を取らせるため培養面を非接着性にする。結果として、接着を阻害された細胞は凝集し、集塊構造をとるようになる。また、この非接着性の機能を生かし、培養面をパターン化、培養細胞に一定の形態を与える目的でも用いられている(神経細胞のシナプス形成の制御等。特開平7-075547号公報等)。

【0005】この非接着性という特性を低下させ、塩基性高分子をコートし選択的な細胞接着性を与え得ることも報告されている(特許第2654744号)。これらの特性

には、吸水性(保水性)を持つという性質が寄与しているが、いわゆる親水性ゲルに分類される材料も細胞培養の分野では古くから用いられている。その用途は異なるがコラーゲンゲルや寒天が代表的なものである。これらは、細胞接着性が必ずしも良好なものではない。しかし、生体にある多くの細胞は、このような保水性のある構造体に囲まれた環境におかれている。

【0006】材料による細胞接着の制御を図ろうとする場合には、蛋白質などの変成しやすいものは加工法に制限が加わり、使い易いものではない。プラスチックと総称される合成高分子が加工法に関してはバリエーションが豊富である。しかし、細胞の接着性という点では適するものは少ない。(そこで表面を親水化するなどの方法が適用される。)水溶性の塩基性高分子などが多く使われている程度である。しかし、これもハードな材料にコートするという使用法であり、生体の組織に近い状態を構成するものではない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】我々は、生体により近い保水可能なゲル状物でありながら、細胞接着も良好な材料を種々検討し、本発明に至ったもので、以下に示す細胞培養基質とその製造方法及びこれを用いた細胞培養方法を提供する。

【0008】

【問題を解決するための手段】即ち本発明の、第1の発明は、ポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)に放射線を照射し細胞接着性高分子と複合化することを特徴とする細胞培養基質の製造方法であり、第2の発明は第1の発明の製造方法で作られることを特徴とする細胞培養基質である。さらに第3の発明は第2の発明の細胞培養基質を用いることを特徴とする細胞培養方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】ポリ(2-ハイドロキシエチルメタクリレート)はそのまま成形加工することも可能であるが、強度等から他の基材にコーティングする方法が好適である。濃度は特に限定されるものではなく、製造法に適した、かつ用途に適した選択が可能である。また形成されるコート層は均一である必要はなく、種々の形態が可能であり、コート基材の選択により形態制御培養の可能な様々な培養基質を形成することができる。

【0010】照射に用いることができる放射線は、電子線、ガンマ線等があるが、好ましくはガンマ線である。線量は形成される培養基質の状態により異なるが、5～50kGyが好適である。塩基性高分子及び細胞接着性蛋白質は、細胞培養に用いることが可能ならばいずれのものも用いることができる。ポリリジン、ポリオニチン、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、フィブロネクチン、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヒトロネクチン、テネイシン等であり、細胞接着性をもつならば特に

限定されるものではない。

【0011】これらの細胞接着性機能を持つ分子との複合化は、まずポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)の層を形成する。これを乾燥した後、ガンマ線を照射し、複合化する細胞接着性高分子を含む水溶液に短時間浸漬する。あるいはコートする方法でもよい。特に温度は限定されないが室温程度から冷蔵温度程度が好ましい。この後、十分な純水または生理的緩衝液で洗浄する。このようにして調製したものは、直ちに使用が可能である。

【0012】または、ポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)の層を形成した後、細胞接着性分子をコートし、その後ガンマ線を照射する方法も好適な方法である。ガンマ線を照射する前には、乾燥する方が適している。細胞接着性高分子をコートする前は、乾燥、非乾燥のいずれの場合も可能である。

【0013】培養法は特に限定されるものではなく、通常の方法が可能である。培養液は、血清添加培地に比べ無血清培地が好ましい。培養細胞も特に限定されるものではない。なお、細胞接着性高分子が安定ならば(ポリリジン、ポリエチレンジイミン等)乾燥後の安定した保管も可能である。そうでなければ冷蔵ないしは冷凍保管が好ましい。

【0014】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づき説明する。

(実施例1、実施例2、比較例) 特開平07-0745541号公報に記載された渡辺の方法を用いてITO層のパターンを形成したポリエーテルスルホンフィルム(住友ベークライト製)を用いてポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)の格子状パターンを形成した。すなわち、フォトレジストをマスキング剤として用いITOのパターンを形成した。直径15mmの円状にカットした。3%のポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)

をスピンコートしたのち、冷塩酸(1mol/l)を用いて超音波洗浄し、ポリ(2-ハイドロキシエチルメタアクリレート)のパターンを形成した。格子間は100μm、格子幅は20μmとした。室温下乾燥後窒素ガスを充填、密封したものに、10kGyガンマ線を照射した。その後50μg/mlのポリリジン溶液に0.5時間浸漬。純水で5回洗浄し培養基質とした(実施例1)。実施例2として、乾燥したパターンを実施例1と同濃度のポリリジン液に2時間浸漬した。純水で3回洗浄、乾燥した後、10kGyガンマ線を照射した。比較例としては、ガンマ線を照射しないものを作成した。

【0015】(培養による実施例と比較例の培養試験) 定法により、ラット胎児(胎生17日)の脳を切り取り、0.25%のトリプシン(SIGMA社製)で5分間処理した。分散後、遠心分離により細胞を分離、DMEM/F-12培養液(SIGMA社製)で再分散した。グリア細胞培養上清を含有する神経細胞用培養液(住友ベークライト製)を用いて、 3×10^4 cells/mlの細胞液を調製した。上記フィルムを24ウェルプレートに入れ、細胞液を500μl加え4日間培養を行った。顕微鏡下で培養状態を観察したところ、実施例1、2では多くの神経細胞がパターン状でネットワークを形成していた。一部にはグリア細胞と思われる細胞が観察された。ただし、パターン上のガイダンス効果は実施例2のほうが優れていた。一方、比較例のほうではネットワークを形成している部分は一部分であった。しかし、グリア細胞と思われる細胞は極くわずかであった。

【0016】

【発明の効果】本発明を用いることにより安定な培養系を得ることができ、細胞に与える薬剤の影響評価、各種因子の検討、細胞間相互作用の検討などが効果的に行える。